

重症筋無力症の病因に関する研究 —抗アセチルコリン受容体抗体の 多様性についての解析を中心に—

金沢大学医学部付属病院神経内科 (主任：高守正治教授)

安 田 厚 子

(昭和61年2月4日受付)

本研究は、異なる抗原決定基を標的とする多様な抗アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) 抗体サブクラスの、重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) 発病及び病態に関する役割を調べることを目的とした。MG 17 症例から得た 45 検体の血清抗 AChR 抗体を 3 つの免疫学的測定法 (抗 IgG を用いた二抗体免疫沈殿法、コンカナバリン A を用いたトキシン・受容体結合阻害活性測定法、AChR 崩壊半減期測定法) で測定し、臨床的重症度や経過、血漿交換療法の効果と比較検討した。二抗体免疫沈殿法、トキシン・受容体結合阻害活性測定法はラット除神経骨格筋由来 AChR を抗原として用い、AChR 崩壊半減期測定法は、ラット骨格筋培養系に補体を不活化した MG 血清を添加して AChR の半減期を測定し、抗原修飾活性を算出した。疾患検出率は、二抗体免疫沈殿法 93.2%、トキシン・受容体結合阻害活性測定法 84.0%、AChR 崩壊半減期測定法 73.9% であった。臨床的重症度との相関性 (10 症例, 28 検体) は、二抗体免疫沈殿法では軽症群と重症群、中等度症群と重症群、AChR 崩壊半減期測定法では軽症群と重症群の間に認められたが、トキシン・受容体結合阻害活性測定法では有意な相関は認められなかった。個々の症例では、6 例中 5 例で 3 指標は臨床的重症度とほぼ対応した経時的变化を示したが、1 例ではこれらの間に対応は認められず、3 指標間に優劣はつけ難かった。血漿交換療法の効果と 3 指標の変化の関係を検討した 7 例のうち、これらすべてに対応が認められたのは 3 例のみであった。従って、本研究で測定した 3 指標だけでは MG の病態を完全に説明できなかった。MG 患者末梢血リンパ球に Epstein-Barr virus を感染させ形質転換する方法で、4 種類のモノクローナル抗体を得た。その 1 つは、ラット除神経骨格筋 AChR に対し高いトキシン・受容体結合阻害活性を示し、二抗体免疫沈殿法でも検出されたが AChR の有意な崩壊促進をおこさず、結合阻害型抗体と考えられた。本抗体 5 mg (非結合阻害型抗体として 25 pmoles toxin binding sites) を雌ルイス系ラットに静注したところ、数時間目より筋力低下が出現し、以後持続した。このラットを 3 日目に屠殺し、実験に供した。横隔膜神経筋標本を用いた電気生理学的検索 (細胞内微小電極法) では、実験的自己免疫性重症筋無力症 (experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) 類似の神経筋伝達障害の存在が確認されたが、電頭による神経筋接合部の検索では、補体介在性の急性期ラット EAMG 類似の形態学的変化は認められず、非結合阻害型モノクローナル抗体による動物への疾患移送実験の報告と異っていた。これらの所見は、AChR のアセチルコリン結合部またはその近傍を標的とする結合阻害型抗体単独で筋無力症様病態を発現せしめ得ることを示しており、この種の抗体が MG の病像を修飾したり、一部の症例やある病期では主要な病因となっている可能性がある。

Key words myasthenia gravis, anti-acetylcholine receptor antibody, heterogeneity.

Abbreviations: ACh, acetylcholine; AChR, acetylcholine receptor; α -BuTx, α -bungarotoxin; EAMG, experimental autoimmune myasthenia gravis; EBV, Epstein-Barr virus; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; EPP, endplate potential; FBS, fetal bovine

神経筋シナプスの情報伝達障害による骨格筋脱力や易疲労性を主な症状とする重症筋無力症 (myasthenia gravis, MG) の研究は、ニコチン性アセチルコリン受容体 (acetylcholine receptor, AChR) とのみ特異的に結合する α -ブングアロトキシン (α -bungarotoxin, α -BuTx) に代表される蛇毒の発見¹⁾や、電気ウナギ、シビレエイ等の魚類電気器官から AChR が多量に得られるようになったこと²⁾により飛躍的な進歩を遂げてきた。電気器官から抽出し精製した AChR で動物を免疫すると MG 類似の実験的自己免疫性重症筋無力症 (experimental autoimmune myasthenia gravis, EAMG) を作製し得ること^{3)~5)}、MG 患者や EAMG 動物血清中に抗 AChR 抗体が高率に検出されること^{4)~6)}、MG, EAMG の血清や免疫グロブリンで動物を受動免疫すると MG 類似の病態が出現すること^{7)~9)}、MG, EAMG の神経筋接合部の電顕像では終板膜側の形態変化と抗体、補体の沈着^{9)~10)}や接合部 AChR 密度の減少がみられる¹¹⁾ ことなどから、現在、MG は神経筋シナプス後膜の AChR に対する抗体によって引き起こされる自己免疫性疾患とされている。抗 AChR 抗体の主な作用機序は、抗原修飾 (antigenic modulation) による AChR 崩壊促進^{12)~14)}や補体介在性終板膜破壊^{10)~15)~16)}による AChR の減少、直接的または受容体の立体構造を変化させることによるアセチルコリン (acetylcholine, ACh) 結合阻害¹⁷⁾とされている。しかし、個々の症例でこれらの作用がどの程度 MG の発現や病態に関与しているかについては必ずしも明らかではない。近年、AChR に対するモノクローナル抗体が作られるようになり、その方法には、魚類電気器官由来の AChR で感作したラット脾細胞とマウス骨髓腫細胞¹⁸⁾または MG 患者末梢血リンパ球とヒト骨髓腫細胞¹⁹⁾を融合させるハイブリドーマ法と、Kamo ら²⁰⁾の MG 患者胸腺リンパ球に Epstein-Barr virus (EBV) を感染させる方法の 2 種類がある。現在では、これを用いて AChR の構造や機能^{21)~22)}、AChR のサブユニットの違い²³⁾や種差²⁴⁾による抗原性の違い、リガンドの結合部位²⁵⁾等の研究、MG 患者血中の多様な抗体サブクラスの解析^{7)~26)}などが行われるようになり、本病の病態解明に一層の進展がみられつつある。

本研究では、MG 患者血清中の抗 AChR 抗体を抗免疫グロブリン G (immunoglobulin G, IgG) 抗体を用いた二抗体免疫沈殿法、コンカナバリン A-セファ

ロースカラム (concanavalin A-sepharose column) を用いたトキシン・受容体結合阻害活性測定法、骨格筋培養系へ抗体を添加して AChR 代謝回転速度への影響をみる半減期測定法の 3 つの免疫学的方法で抗原決定基を異にする抗体を定量し、それぞれを臨床的重症度や経過、血漿交換療法の効果と比較検討した。さらに、MG 患者末梢血リンパ球の EBV 感染による形質転換法で抗 AChR モノクローナル抗体を作製し、上述の 3 つの免疫学的指標測定による抗原決定基解析や動物への受動免疫による疾患移送実験を行い、多様な抗 AChR 抗体サブクラスの MG 発現機序や病態に関する役割の解明を試みた。

対象および方法

1. 抗 AChR 抗体価^{6)~27)}

1. ラット除神経骨格筋、ヒト骨格筋、シビレエイ電気器官由来 AChR の抽出

雄ウィスター (Wistar) ラットの両側大腿部を切開し、坐骨神経を 1 cm 以上切除した。10~14 日後、下肢筋を取り出し細切した後、約 4 倍量の緩衝液 (NaCl, 0.1 M; phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1 mM; NaN₃, 0.02%; trasyrol 250 U/ml を含む 0.05 M Tris-HCl, pH 7.4) を加えてホモゲナイズし、10,000 rpm で 30 分間遠心した。沈渣を緩衝液で 2 倍に希釈して Triton X-100 (和光純薬) を最終濃度 1% になるように加え、4°C で一晩攪拌した。これを 10,000 rpm で 30 分間遠心して得た上清をラット除神経骨格筋 AChR 分画とし、抗体価測定のための抗原として用いた。ヒト骨格筋 AChR は胸部外科手術時に採取したヒト肋間筋を、シビレエイ電気器官 AChR は日本近海産シビレエイ (*Narke japonica*) から採取した電気器官を材料とし、ラットの場合と同様、脂肪や結合組織を除去した後ホモゲナイズし、Triton X-100 で抽出した。

2. 二抗体免疫沈殿法

¹²⁵I- α -BuTx (Amersham Products Inc.) で標識した AChR 200 μ l に 100 倍希釈した被検血清 50 μ l を加え、一晩 4°C 下に放置した。抗ヒト IgG (Hoechst) を加えてさらに一晩 4°C 下に置いた後、3,500 rpm で 10 分間遠心し、沈殿した ¹²⁵I- α -BuTx・AChR・抗 AChR 抗体・抗ヒト IgG 複合物の放射活性を測定し、同じ放射活性を示す ¹²⁵I- α -BuTx 1 ml あたりの pmole 数で表わした (pmole toxin binding site/ml,

serum; IgG, immunoglobulin G; MEM, minimum essential medium; MEPP, miniature endplate potential; MG, myasthenia gravis; PBS, phosphate buffered saline; pmole t. b. s., pmole toxin binding site; TPA, 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate.

pmole t. b. s./ml). 金沢大学付属病院神経内科において測定した正常人 40 人の抗体価の平均値±標準偏差 (Mean±SD) は 0.72 ± 0.08 pmol t. b. s./ml で、 0.8 pmole t. b. s./ml (Mean+1 SD) 以上を異常とした。

3. トキシン・受容体結合阻害活性測定法 (コンカナバリン A 法)

1 pmole t. b. s./ml 前後に緩衝液で調整した AChR 250 μ l に被検血清 50 μ l を添加し、一晚 4°C 下で反応させた。 125 I- α -BuTx 0.3 pmole を加えて 4°C 下に放置した後、コンカナバリン A-セファロースカラム (Pharmacia Fine Chemicals) を通してコンカナバリン A に AChR を吸着させてカラムの放射活性 (RAMC) を測定し、正常血清添加時の測定値 (RAcontrol) に対する減少率

$$\left(\frac{RA_{control} - RAMC}{RA_{control}} \times 100 \right)$$
 から阻害活性 (blocking activity) を求めた。正常血清の本法測定値の平均を 0% と定め、金沢大学付属病院神経内科における正常人 25 人を対象とした測定値の標準偏差の 2 倍 ($0 + 2$ SD), すなわち 10% 以上を異常とした。

II. AChR 崩壊半減期

1. 骨格筋細胞培養^{(12)~(14)} (図 1)

胎生 18~20 日目のウィスター系ラット胎児の下肢筋を無菌的に採取し、結合組織や血管を除去後、細切、0.3% トリプシン (trypsin, 1: 250, Difco Laboratories) 処理により単細胞浮遊液を作った。これをプラスチックペトリ皿 (Corning Glass works) に分注し、24~48 時間培養した後、3 回洗浄して赤血球を除去した。再びトリプシン (0.03%) 処理により単細胞浮遊液とした後、筋芽細胞と線維芽細胞の底面付着速度の差を利用して線維芽細胞を選択的に除去するために、

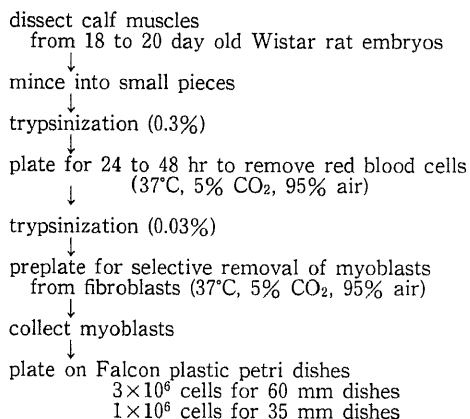


Fig. 1. Culture method for primary rat skeletal muscle cell

プラスチックペトリ皿中にて 15~30 分間培養し筋芽細胞に富んだ上清を採取した。最後にこれをプラスチックペトリ皿に分注し、発育・増殖させて AChR 崩壊半減期の測定に供した。各ペトリ皿に分注する細胞数は、直径 60 mm のペトリ皿では 3×10^6 個、直径 35 mm の場合は 1×10^6 個とした。培養液は牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS, 和光純薬) 10%, ペニシリン (penicillin, P-L Biochemicals Inc.) 1 万単位、ストレプトマイシン (streptomycin, Sigma Chemicals) 10 mg/dl を含む Eagle の MEM (minimal essential medium, GIBCO Diagnostic Laboratories) を用いた。培養は 37°C, 5% CO₂, 95% air 下で行い、2~3 日おきに培養液を交換した。

3. AChR 崩壊半減期測定 (図 2)

125 I- α -BuTx で標識された細胞表面の AChR は、細胞内へ取り込まれ代謝を受けた後、 125 I-チロジンとして細胞外へ放出されるので、培養液の放射活性を経時的に測定することにより AChR 崩壊速度を間接的に測定できる^{(28)~(30)}。この測定には 5~7 日目の骨格筋培養細胞を使用した。培養液に 4 nM の 125 I- α -BuTx を入れ、2 時間培養して AChR を 125 I で標識した後、上清を捨て、培養液で 3 回洗浄して AChR と結合していない 125 I- α -BuTx を除去した。次に MG 患者または正常者の血清を 15% 含む培養液を加え、さらに 2 時間培養した。被検血清はすべて 56°C で 30 分間加熱し、補体を失活させて実験に供した。以後、一定時間ごとに培養液中の培養液をすべて採取し、代りに被検血清を含まない新しい培養液を入れて培養を続けた。培養はすべて 37°C, 5% CO₂, 95% air 下にて行った。各区分間時間に採取した培養液のそれぞれについて放射活性 (RA_{med-i} , $i = 1, 2, \dots, k, \dots, n$) を測定し、最後に細胞に結合したまま残っている 125 I- α -BuTx 量を調べるために、ペトリ皿に付着しているすべての細胞を rubber policeman で集めて放射活性 (RA_{cell}) を測定した。ある区分時間 (I_k) に崩壊した AChR 量の全培養骨格筋 AChR 量に対する割合 ($FD-I_k$) および、ある区分時間 (I_k) 終了時における AChR の残存率 ($FR-I_k$) は次の式より算出した。

$$FD-I_k(\%) = \frac{RA_{med-k}}{\sum_{i=1}^n RA_{med-i} + RA_{cell}} \times 100$$

$$FR-I_k(\%) = 100 - \sum_{i=1}^k (FD-I_i)$$

さらに、崩壊半減期は AChR 残存率を片対数グラフ上に経時的に記入して求め、抗原修飾活性 (antigenic modulation activity) または AChR 崩壊促進活性) を次式より算出した。

antigenic modulation activity(%)

$$= \frac{H-L_{control} - H-L_{MG}}{H-L_{control}} \times 100$$

但し, $H-L_{control}$, 正常血清添加時の AChR 崩壊半減期; $H-L_{MG}$, MG 血清添加時の AChR 崩壊半減期。

なお, 培養系への抗体添加量と AChR 崩壊への影響の関係をみる時は, 0.15%, 1.5%, 15%, 30% と異なる濃度の被検血清を含む培養液を各検体ごとに作り, 既述の被検血清 15% を含む培養液の代りに使って同様の方法で AChR 崩壊半減期を測定, 抗原修飾活性を算出した。崩壊測定開始時における培養系の骨格筋細胞表面 AChR 量を, 全培養時間の培養液の放射活性と細胞に残存した放射活性の合計 ($\sum_{i=1}^n RA_{med-i} + RA_{cell}$) と同じ放射活性を示す ^{125}I - α -BuTx の pmole 数で表わし (pmole t.b.s.), これに対する二抗体免疫沈殿法で測定した添加抗体量 (pmole t.b.s.) の割合を抗原修飾活性と比較した。

以上の実験は, duplicate か triplicate で行い, 放射活性の測定にはオートウェルタイプ γ カウンター (アロカ ARC 505) を使用した。

III. モノクローナル抗体

1. モノクローナル抗体作製 (図 3)

MG 患者末梢血約 10 ml から Ficoll-paque (Pharmacia Fine Chemicals) にてリンパ球約 1×10^7 個を分離し, EBV (B 95-8) 培養上清 (Electro-nucleonics Laboratories Inc.) 5 ml を加えて 1 時間

培養後, 細胞数 $2-4 \times 10^6$ /ml に調整, 随時培養液を更新しながら組織培養フラスコ (Nunc Products) 中で約 1 ケ月間培養した。培養は 37°C , 7% CO_2 , 93% air 下にて行い, 培養液は TPA (12-o-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate, L.C. Service) 0.5 ng/ml, FBS 15% を含む RPMI-1640 (GIBCO Diagnostics Laboratories) を使用した。シビレイ電気器官またはラット除神経骨格筋由来 AChR を抗原として, 培養上清中の抗体を酵素免疫吸着法 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) で検出し, 抗体産生細胞を選出した。マウス胸線細胞 (5×10^5 /well) を供給細胞とし, 限界希釈法にて増殖, クローニングを繰り返し, 3~5 週間後, クローン上清中の抗体を ELISA 法 (抗原: 同上) にて再検し, 本研究に適するものを選んだ。これらのクローン上清を集め, 硫酸アンモニウム法で免疫グロブリンを分離, さらに抗ヒト IgG-セファロース・アフィニティクロマトグラフィ (anti-human IgG-sepharose affinity chromatography) にて IgG を精製した後, 凍結乾燥して保存, 実験に供した。対照として, 正常ヒト血清から同様の方法で IgG (ポリクローナル) を精製した。

2. ELISA 法³¹⁾

マイクロウェルプレートにシビレイ電気器官またはラット除神経骨格筋由来の AChR を加え, 室温で 30 分間放置してプレート壁に AChR を付着させた。さらに FBS を 5% 含むリン酸緩衝食塩水でプレートを満たし室温で 30 分間放置して, AChR が付着しな

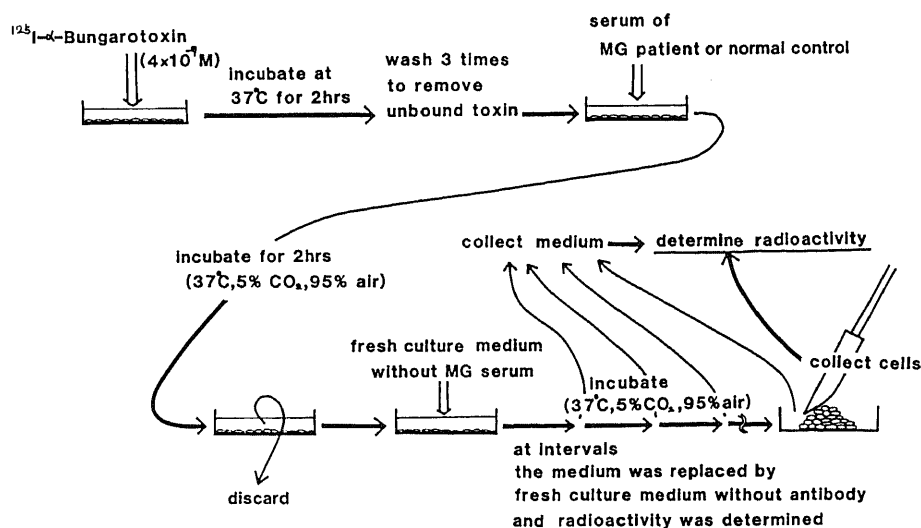


Fig. 2. Measurement of the effect of MG serum on the degradation of cultured rat skeletal muscle AChR.

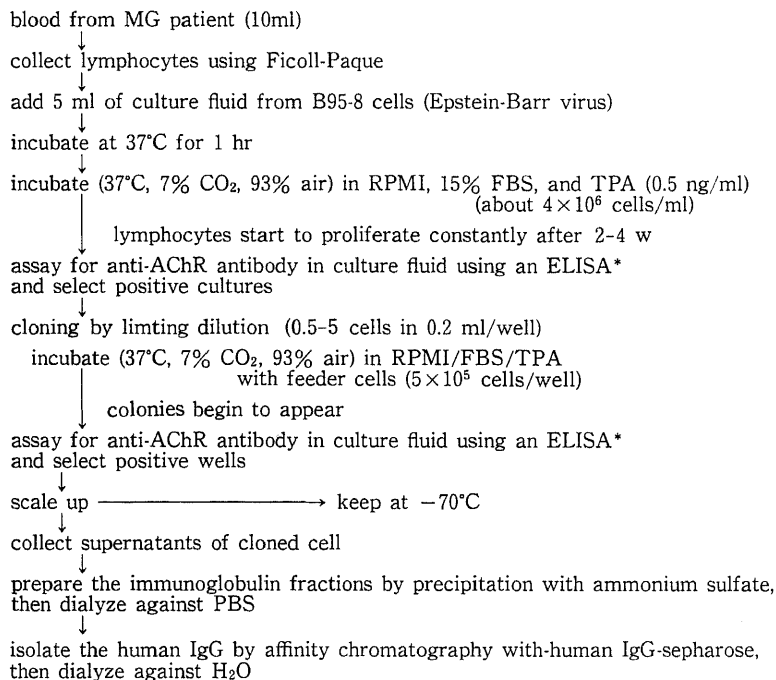


Fig. 3. Preparation of monoclonal anti-AChR antibody from peripheral lymphocytes of MG patient by Epstein-Barr virus infection. TPA, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate; FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate buffered saline; ELISA, enzyme linked immunosorbent assay. *, The antigen used was AChR obtained from either the electric organ of *N. japonica* or denervated rat skeletal muscle.

かった壁面をFBS蛋白で埋めた。これにMG患者リンパ球培養上清液50 μ lを入れ、4°Cで16時間反応させた。次にビオチン化抗ヒトIgG (biotinyl-anti-human IgG, Vector Laboratories Inc.) を10 μ g/ml含むFBS含有リン酸緩衝食塩水を加え室温で1時間放置した後、1 μ g/mlのワサビペルオキシダーゼ-アビジンD (horseradish peroxidase-avidin D, Vector Laboratories Inc.) を含むトリス塩酸食塩水を加えて10分間放置し、これにペルオキシダーゼの基質溶液を室温で15分間反応させ、414 nmの吸光度を測定した。

3. 3つの免疫学的指標の測定

各モノクローナル抗体をリン酸緩衝食塩水で1 mg/mlに調整し、ラット除神経骨格筋、ヒト骨格筋由来のAChRを抗原として既述の如く、二抗体免疫沈殿法、トキシン・受容体結合阻害活性測定法で抗体価を測定した。AChR崩壊半減期測定は、被検血清含有培養液の代りにモノクローナル抗体0.2 mg/ml含有培養液を用い、既述の如く行った。3法の正常対照には、それぞれ等量の正常ヒトIgGを用いた。

4. モノクローナル抗体による疾患移送

ルイス (Lewis) 系雌ラット (8週令) に生理的食塩水に溶解したモノクローナル抗体5 mgを静注し、3日目に横隔膜神経筋標本を摘出、神経筋接合部の電気生理学的 (微小電極法) および形態学的 (電顕) 検索を行い、等量の正常ヒトIgGを含む生理的食塩水静注ラット (1匹) を対照として比較した。電気生理学的検索には、左横隔膜筋を用い、5% CO₂混合のO₂を気泡化して吹込んだ37°Cのリンゲル液 (NaCl, 122 mM; KCl, 4.7 mM; NaHCO₃, 155 mM; MgCl₂, 1.2 mM; KH₂PO₄, 1.2 mM; CaCl₂, 2.6 mM; glucose, 11.5 mM; PH 7.4) で灌流中、3 M KClを充填したガラス微小電極 (5-7 M Ω) にて観察した。自発性微小終板電位 (miniature endplate potential, MEPP) は立ち上がり時間0.6 msec以下のものをとり上げ、non-linear summation補正や静止膜電位補正に採用する平衡電位は-15 mV、標準静止膜電位は-77 mVとした。ACh量子性遊離量 (ACh quantum content) は、灌流液中にd-ツボクラリン (d-tubocurarine chloride, 和光純薬) を添加し、1 Hzの反復電気刺激

中に記録される終板電位 (endplate potentials, EPPs; 60 発目~109 発目) 振幅の平均値 (EPP) および標準偏差 (SD_{EPP}) から次式により算出した³²⁾。

$$\text{ACh quantum content} = (\text{EPP}/\text{SD}_{\text{EPP}})^2$$

神経筋接合部の電顕観察には右横隔膜筋を用い、伸展位に保ち 4%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド固定液 (0.1 M カコジル酸緩衝液) にて 2~3 時間前固定した後、緩衝液で洗浄した。神経筋接合部を含む小切片を切り出して 1.5%オスミウム酸 (0.1 M カコジル酸緩衝液) にて 2 時間固定後、常法に従いアルコール脱水し、エポン 812 に包埋した。超薄切片を作製し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で電子染色後、電顕観察に供した。

IV. ヒト対象 (表 1)

抗体活性の検討には、MG 患者 17 人 (各患者から時期を異にして採取した試料、総計で 45 検体)、対照として健康成人 4 人 (4 検体) の血清を用いた。このうち MG 患者 10 人 (表 1-A, 症例 1~10) の血清 (28 検体) の抗 AChR 抗体活性について臨床的重症度や臨床経

過との対比を行った。臨床的重症度は Drachman ら³³⁾ の基準に準じ、その class 5 を重症、class 4・3 を中等度症、class 2・1 を軽症とした。また、血漿交換療法を受けた 7 人 (表 1-B, 症例 11~17) の治療前後の血清について、治療の効果と 3 つの免疫学的指標の変化の関係を調べた。血漿交換は Bag-system で 1 シリーズ、2~10 回行い、シリーズ開始直前およびシリーズの最終回に得た試料を本研究に供した。

V. 推計学的処理

得られたデータは平均値±標準偏差 (Mean±SD) で表わした。平均値間の有意差は分散分析後 Duncan の多重比較法により検定し、相関係数の有意性の検定には Student の t 検定を用い、いずれも 5%未満の危険率をもって有意とした。

成 績

I. 抗 AChR 抗体価

1. 二抗体免疫沈殿法

Table 1. MG patients whose sera were studied (A)

Case No.	Age	Sex	Thymoma	Clinical classification of severity		Therapy received for the period of this study (received previously)
				Group (Osserman)	Class (Drachman)	
1	54	M	+	III	5→5	Ra, St, ChE, (Ra, St, ChE)
2	28	F	+	III	5→4	St, ChE (Th, St)
3	26	F	—	II B	5→4	Th, St, ChE
4	44	F	—	III	5	St, ChE, (Th)
5	58	M	+	II B	4→4	Th, Ra, St, ChE
6	54	M	—	II B-A	3→3	St, ChE, Th, (ChE, St)
7	36	F	—	I	2	(Th, St)
8	42	F	—	I	2→2	Th, St,
9	25	F	—	I	1	—
10	60	F	—	II A	2	(Th, St)

(B)

Case No.	Age	Sex	Thymoma	Group (Osserman)	Therapy		Plasmapheresis	
					Thymec.	St	Times	Effect
11	25	M	+	II B	+	—	6	—
12	36	F	—	II B	—	—	7	+
13	33	F	—	IV	+	+	8	+
14	30	F	+	II B	+	+	2	+
15	25	F	—	IV	+	+	10	+
16	40	F	—	IV	—	—	5	+
17	31	M	—	II B	+	—	?	+

Relationship between the clinical severity and each of the immunological determinations of anti-AChR antibody was studied in cases 1-10 (Table A). Cases 11-17 were treated by plasmapheresis (Table B). Ra, radiation therapy; St, steroid therapy; ChE, anticholinesterases; Th, thymectomy.

正常対照者4人の抗体価(検体数4)は、全例0.8 pmole t.b.s./mlより低かった。MG患者17人の血清45検体の抗体価は0~250 pmole t.b.s./ml(平均 27.0 ± 49.6 pmole t.b.s./ml)で異常検出率は93.2%であった。

2. トキシン・受容体結合阻害活性測定法

正常対照者は4人とも10%より低かったが、MG患者血清45検体の阻害活性は0~58%(平均 $21.2 \pm 15.4\%$)で、異常検出率は84.0%であった。

II. AChR 崩壊半減期測定法

1. 正常対照者(図4)

15回の実験シリーズに、正常血清4検体の一部を供し、合計22回の対照測定とした。これらのAChR残存率の経時変化は、いずれの実験シリーズや血清でも片対数グラフ上ほぼ一直線となり、崩壊半減期は13.2~19.5時間(平均 16.04 ± 1.70 時間, $n=22$)で、既報のラット骨格筋 extrajunctional AChRの崩壊半減期^{30),34)}と一致する結果であった。同一シリーズで3人の正常血清(3検体)について崩壊半減期を測定したところ、その変異係数(CV%)は5.2%であり、抗原修飾活性の正常範囲を $\pm 15\%$ とした。

2. MG血清によるAChR崩壊への影響(図5)

MG血清を添加すると後述するように34検体で種々の程度のAChR崩壊促進が認められたが、有意な崩壊促進作用を示した検体ではAChR残存率の経時

的变化は片対数グラフ上2相性を示した。すなわち、前半、AChR崩壊は著明に促進されたが、後半は遅くなり、同一シリーズの正常血清添加例とほぼ等しい崩壊速度となった。従って、前半の崩壊速度の速い部分は抗体による修飾を受けたAChRの崩壊を示し、後半は修飾を受けなかったAChRの崩壊を示していると思われる。

3. 添加抗体量との関係(図6)

MG血清8検体(8症例)について調べた。培養系への添加濃度が高いほど崩壊は促進される傾向にあった。培養骨格筋AChR量に対する添加抗AChR抗体量の比が1:1前後からAChR崩壊の促進が認められるようになり、少なくとも500:1までは抗体が多くなるほど崩壊促進は著明となった。1検体(図6, 症例6)では10:1まで増量しても崩壊促進は出現しなかった。

4. 異常検出率

MG血清45検体(17症例)のうち抗原修飾活性が正常照の15%以上であったのは34検体(11症例)であり、本法による異常検出率は73.9%であった。

III. 3つの免疫学的指標相互の関係(図7-a,b,c)

MG血清43検体(17症例)について調べた。抗原修飾活性と10を底とする常用対数で表わした二抗体免疫沈殿法による抗体価との間には有意の相関($r=0.762$, $p<0.01$)が認められた(図7-a)が、抗原修飾

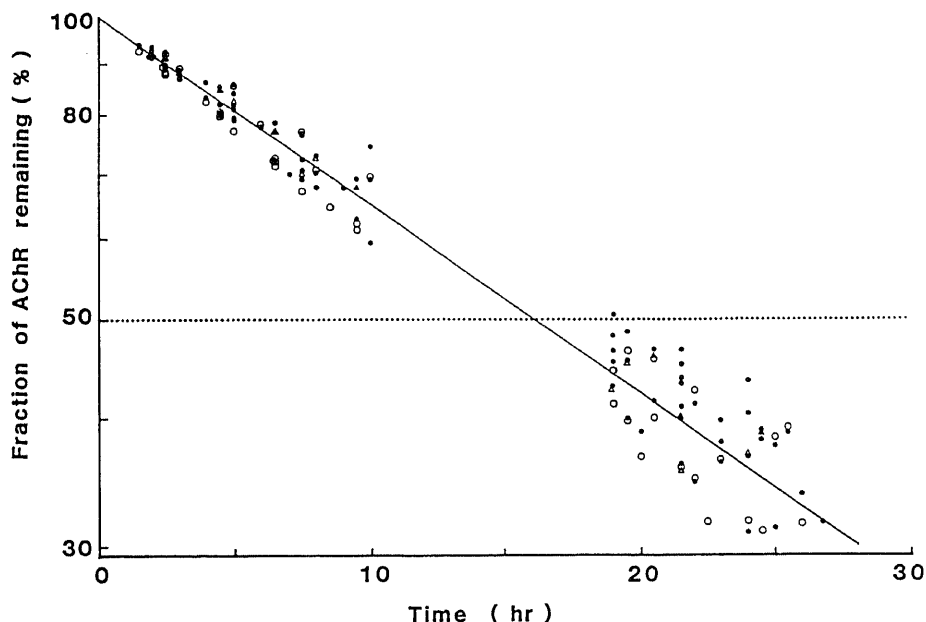


Fig. 4. AChR degradation in vitro (normal controls). Twenty-two control measurements were done in duplicate or triplicate by using the serum from four normal subjects. Different symbols indicate different subjects.

活性とトキシン・受容体結合阻害活性の間には有意の相関は認められなかった(図7-b)。常用対数で表わした二抗体免疫沈殿法による抗体価とトキシン・受容体結合阻害活性の間には、有意の相関($r=0.495$, $p<0.01$)が認められた(図7-c)。

IV. 臨床的重症度と3つの免疫学的指標 (図8-a,b,c)

MG 10 症例(28 検体)のうち重症は4例(9 検体), 中等度症は4例(10 検体), 軽症は5例(9 検体)であった。各重症度ごとの二抗体免疫沈殿法による測定値の平均は, 中等度症群(12.24 ± 13.76 pmoles t.b.s./ml)と重症群(76.32 ± 83.28 pmoles t.b.s./ml), 軽症群(8.49 ± 7.89 pmoles t.b.s./ml)と重症群の間に有意差(両群間とも $0.01 < p < 0.05$)が認められた(図8-a)。抗原修飾活性は, 軽症群(平均 $11.97 \pm 11.30\%$)と重症群(平均 $38.0 \pm 11.55\%$)の間に前法の場合より著明な有意差($p < 0.01$)が認められた(図8-b)が,

トキシン・受容体結合阻害活性測定法では各重症度間に有意差は認められなかった(図8-c)。

V. 個々の症例における臨床的重症度と3つの免疫学的指標の経時の変化(図9; 表1)

個々の症例においては, 3つの免疫学的指標は6例中5例(図9; 表1, 症例1~3・5・8)でほぼ同じような経時の変化を示し, それらは臨床的重症度の変化にほぼ対応したが, 1例(図9; 表1, 症例6)ではこれらの経時の変化に対応は認められなかった。このような傾向には, 胸腺腫の有無, 疾患重症度, 性, 年齢等による影響はないと思われた(表1参照)。

VI. 血漿交換療法の効果と3つの免疫学的指標 (図10)

血漿交換前後の3指標の変化を図10(図中の症例番号は表1に対応)に示す。本治療を受けた7例中6例で臨床症状の改善が認められた。血漿交換有効3例(図10; 表1, 症例15~17), 無効1例(図10; 表1,

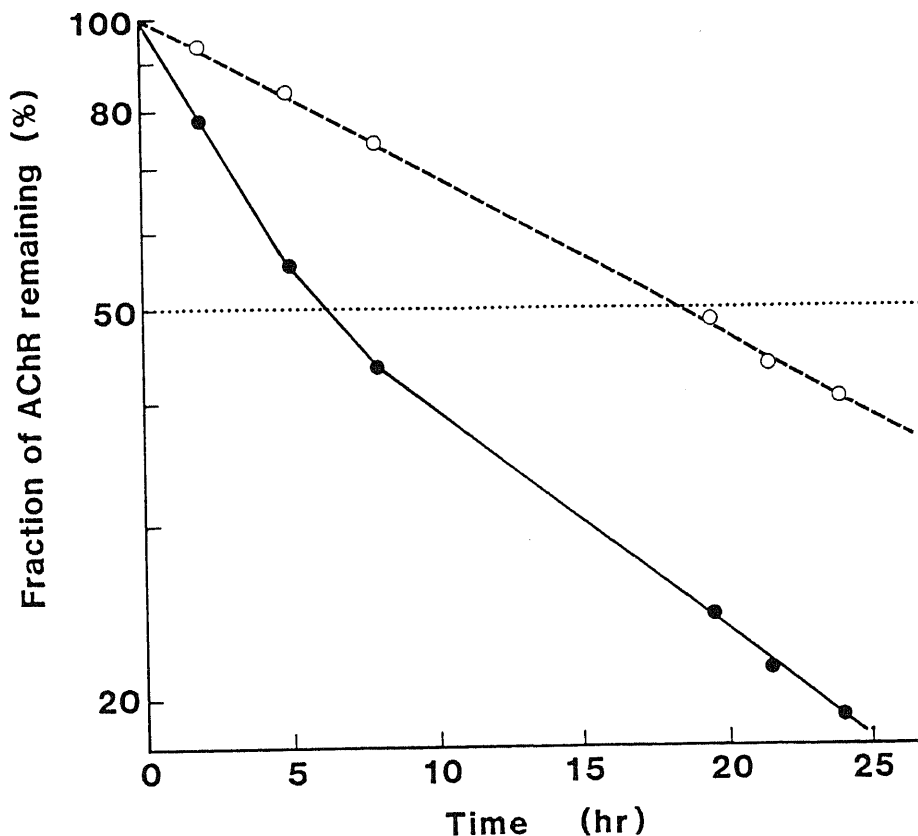


Fig. 5. AChR degradation in vitro. Typical pattern of AChR degradation modified by myasthenic serum. Sera were determined in triplicate in the same assay. Case 17 (see patient data, Table 1), ●—●; control serum, ○---○.

症例 11) では、治療後、3 種類の抗体活性は種々の程度に低下した。2 例 (図 10; 表 1, 症例 13・14) では治療による臨床症状の改善が認められたにもかかわらず、治療後、トキシン・受容体結合阻害活性が上昇した。症例 13 では抗原修飾活性、二抗体免疫沈殿法による抗体価は治療前後でほとんど変化せず、症例 14 では両者の低下が認められた。1 例 (図 10; 表 1, 症例 12) の 3 指標はすべて治療前から正常範囲内にあり、治療後もほとんど変化は認められなかったが、臨床像は治療に良く反応した。すなわち、血漿交換療法の効果と 3 指標それぞれの間に関係は認められなかった。

VII. モノクローナル抗体

3 人の MG 患者末梢血リンパ球の EBV 感染による形質転換細胞クローン上清から、4 種類のモノクローナル抗体を得た。表 2 に、それぞれの抗体についての 3 つの免疫学的指標の測定値を示す。

1. 3 つの免疫学的指標 (表 2)

mAb-2, mAb-3, mAb-4 はラットやヒト由来の AChR を抗原とした二抗体免疫沈殿法で検出されず、ラット AChR の崩壊促進もおこさなかったが、トキシ

ン・受容体 (ラット, ヒト) 結合阻害活性測定法では抗体活性が証明された。mAb-1 はラット AChR を抗原とした二抗体免疫沈殿法で検出されたが、培養系への本抗体添加により有意な抗原修飾活性は認められなかった (4.3%)。本抗体を 0.2 mg/ml の濃度で添加した場合の培養骨格筋 AChR 量に対する抗体量の比は 6:1 であったが、さらに抗体濃度を 0.5 mg/ml (添加抗体量/培養 AChR 量=13:1) としても抗原修飾活性の増加は認められなかった (-2.2%)。本抗体はラット AChR を抗原として高いトキシン・受容体結合阻害活性 (52%) を示した。

2. ラットへの疾患移送

ラット AChR を抗原とした測定で高いトキシン・受容体結合阻害活性を示した mAb-1 抗体 (表 2) を用いて、ルイス系雌ラットへの疾患移送実験を行った。注射後数時間目にはすでに臨床生活上活動性の低下が認められたが、3 日目、なお筋力低下が続いている時点 (写真 1-B) で屠殺した。横隔膜神経筋標本を取り出し電気生理学的解析を行ったところ、MEPP 振幅の低下が認められた (表 3-B) が、静止膜電位、ACh 量子性遊離量

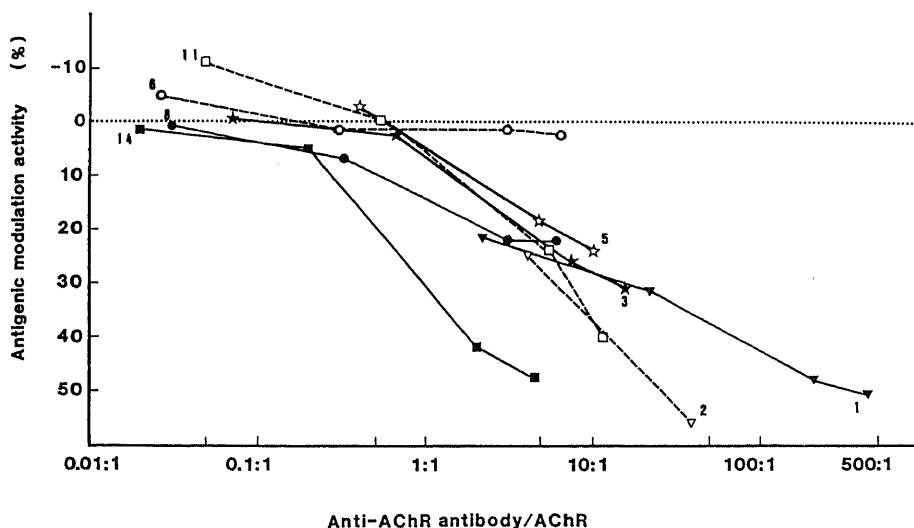


Fig. 6. Effect of different concentrations of myasthenic serum on AChR degradations.

The amount of anti-AChR antibody added to the culture medium (determined by the immunoprecipitation assay)/the amount of AChR on cultured myotubes was plotted against the antigenic modulation activity. Antigenic modulation activity (%) = $\frac{H-L_{control} - H-L_{MG}}{H-L_{control}} \times 100$ H-L control, half-life of AChR exposed to control serum; H-L_{MG}, half-life of AChR exposed to MG serum.

The intra-assay coefficient of variation for control sera was 5.2%. Sera from MG patients that induced antigenic modulation activity above 15% of control were considered positive. The numbers next to the eight symbols correspond to the cases described in Table 1.

には対照との間に有意差はなく、EAMG 類似の所見³⁵⁾であった。しかし、神経筋接合部の電顕像は、対照(写真 2-A)と比べて変化は認められなかった(写真 2-B)。

考 察

AChR の構造や機能についての研究は主に魚類電気器官由来の AChR でなされており、4 種類のサブユニット ($2\alpha, \beta, \gamma, \delta$) から成る分子量約 250,000 の糖蛋白である³⁶⁾。哺乳類の骨格筋 AChR もほぼ同様の構造をしていると考えられ^{36)~38)}、モノクローナル抗体を使った検索では、MG 患者血中にこれらすべてのサブユニットの種々の部位に対する抗体が認められている^{26), 38)}。MG 患者血清中の抗体は α -BuTx の AChR への結合を阻害する「結合阻害型」と、阻害しない「非結合阻害型」に大別され、測定の方法によって AChR 上の抗原決定基を異にする抗体サブクラスを分けて定量することができる。結合阻害型抗体はトキシン・受

容体結合阻害活性測定法で検出され、 α -サブユニットの ACh 結合部またはその近傍を標的として、競合的あるいは立体構造を変化させることにより ACh の結合を阻害して神経筋伝達障害をおこす^{17), 26)}。本研究で行ったコンカナバリン A 法は、この種の抗体の他に AChR の糖鎖に対する抗体をも同時に検出する可能性も理論的にはありうる^{27), 40)}。糖鎖結合抗体に MG 発現性があるという報告はない。一方、非結合阻害型抗体は二抗体免疫沈殿法で検出され(糖鎖結合性抗体も検出されうる)、トキシン結合部以外の α または他のサブユニットと結合するが、その多くは α -サブユニット上の“main immunogenic region, MIR”を標的とし²¹⁾、AChR 崩壊促進作用を有する抗体や補体介在性膜破壊をおこす抗体とされている¹⁴⁾。また、 α 以外のサブユニットを標的とする抗体の少なくとも一部は、AChR のもう一つの機能として知られるイオン透過性制御機構障害をもたらし作用がある⁴¹⁾。非結合阻害型抗体と AChR の結合には 3 つの型があり、2 価抗

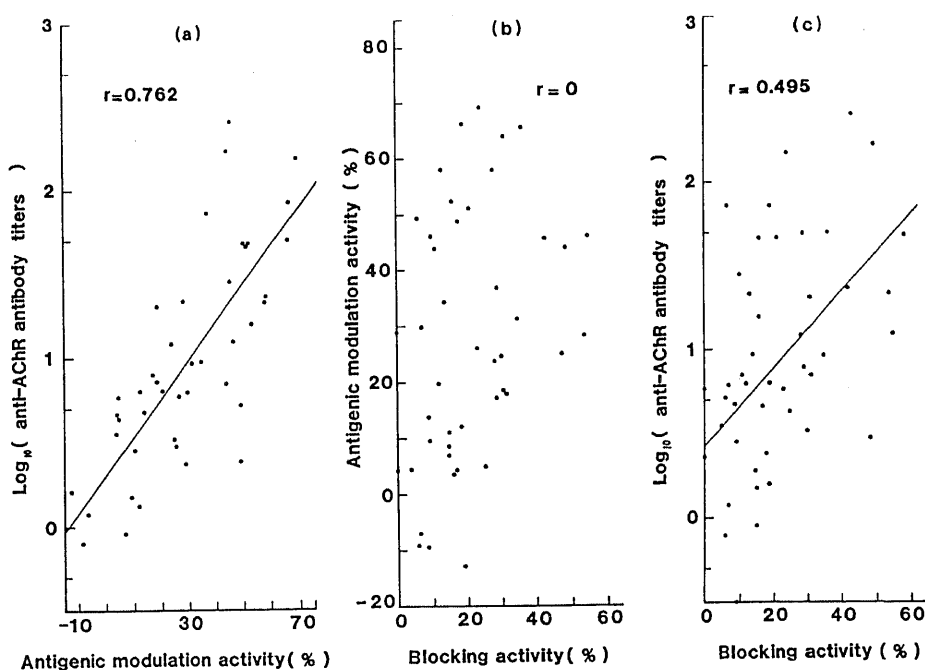


Fig. 7. Relationship between immunological determinations. (a), antigenic modulation activity (X) vs the \log_{10} of the anti-AChR antibody titers measured by the immunoprecipitation assay (Y) ($Y=0.0225X+2.5592$, $r=0.762$, $p<0.01$); (b), blocking activity by concanavalin A-sepharose assay (X) vs antigenic modulation activity (Y) ($r=0$); (c), blocking activity by concanavalin A-sepharose assay (X) vs the \log_{10} of the anti-AChR antibody titers measured by immunoprecipitation assay (Y) ($Y=0.0228X+0.4304$, $r=0.4954$, $p<0.01$). The blocking activity of the anti-AChR antibodies was expressed as a percentage of the inhibition in producing the AChR-¹²⁵I- α -BuTx complex absorbed in the concanavalin A-sepharose column compared to the controls.

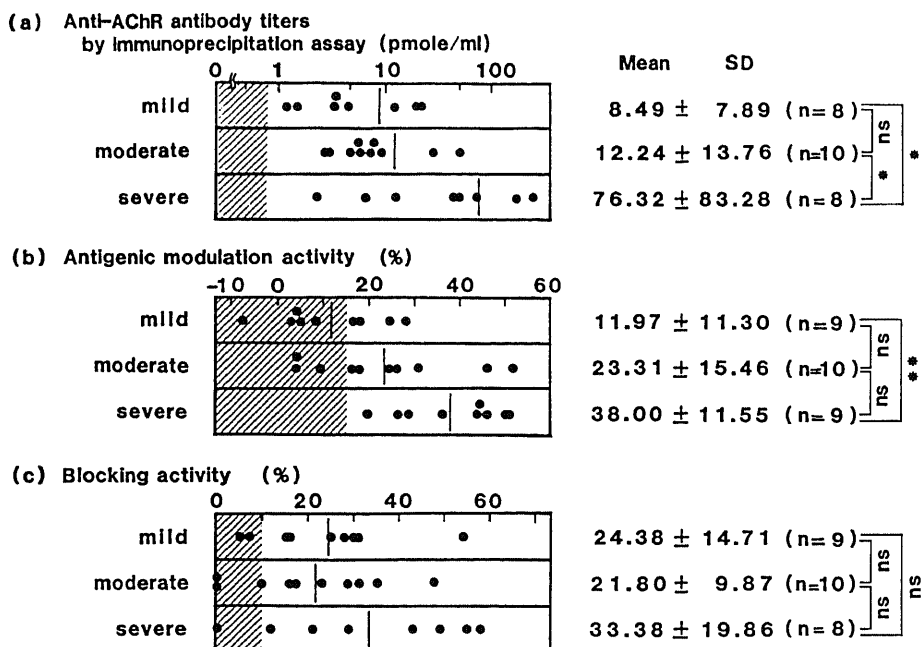


Fig. 8. Relationship between the clinical severity and each of the immunological determination of anti-AChR antibody. Hatched areas indicate normal ranges; vertical lines denote the mean values; SD, standard deviation; ns, not significant. *, $0.01 < p < 0.05$; **, $p < 0.01$ (Duncan).

Table 2. Immunological activities of monoclonal anti-AChR antibodies

Clone	Antigenic modulation activity (%)	Anti-AChR antibody titers by immunoprecipitation assay (pmoles/mg)		Blocking activity by concanavalin A-sepharose assay (%)	
		Source of antigen		Source of antigen	
		Rat	Human	Rat	Human
mAb-1	4.3	5.0	N.D.	52	N.D.
mAb-2	5.9	0	0	21	19
mAb-3	-2.2	0	0	23	20
mAb-4	0.7	0	0	20	18
Control	0	0	N.D.	0	N.D.

Half-lives of AChR modified by the antibodies ($0.2\text{mg/ml} \times 2\text{ml/well}$) were measured using cultured rat skeletal muscle. The antigenic modulation activities were defined by the formula of: $\frac{H-L_{\text{control}} - H-L_{\text{MG}}}{H-L_{\text{control}}} \times 100$. $H-L_{\text{control}}$, half-life of the AChR exposed to the normal human IgG; $H-L_{\text{MG}}$, half-life of the AChR exposed to the monoclonal anti-AChR antibody. Monoclonal antibodies that induced the antigenic modulation activity above 15% of control were considered positive. Antigens (AChR) used to measure antibody titers by immunoprecipitation assay and blocking activities by concanavalin A-Sepharose assay were obtained from denervated rat skeletal muscle and human muscle known to be free of neurological disease. Normal human IgG was used as a control. N.D., not determined.

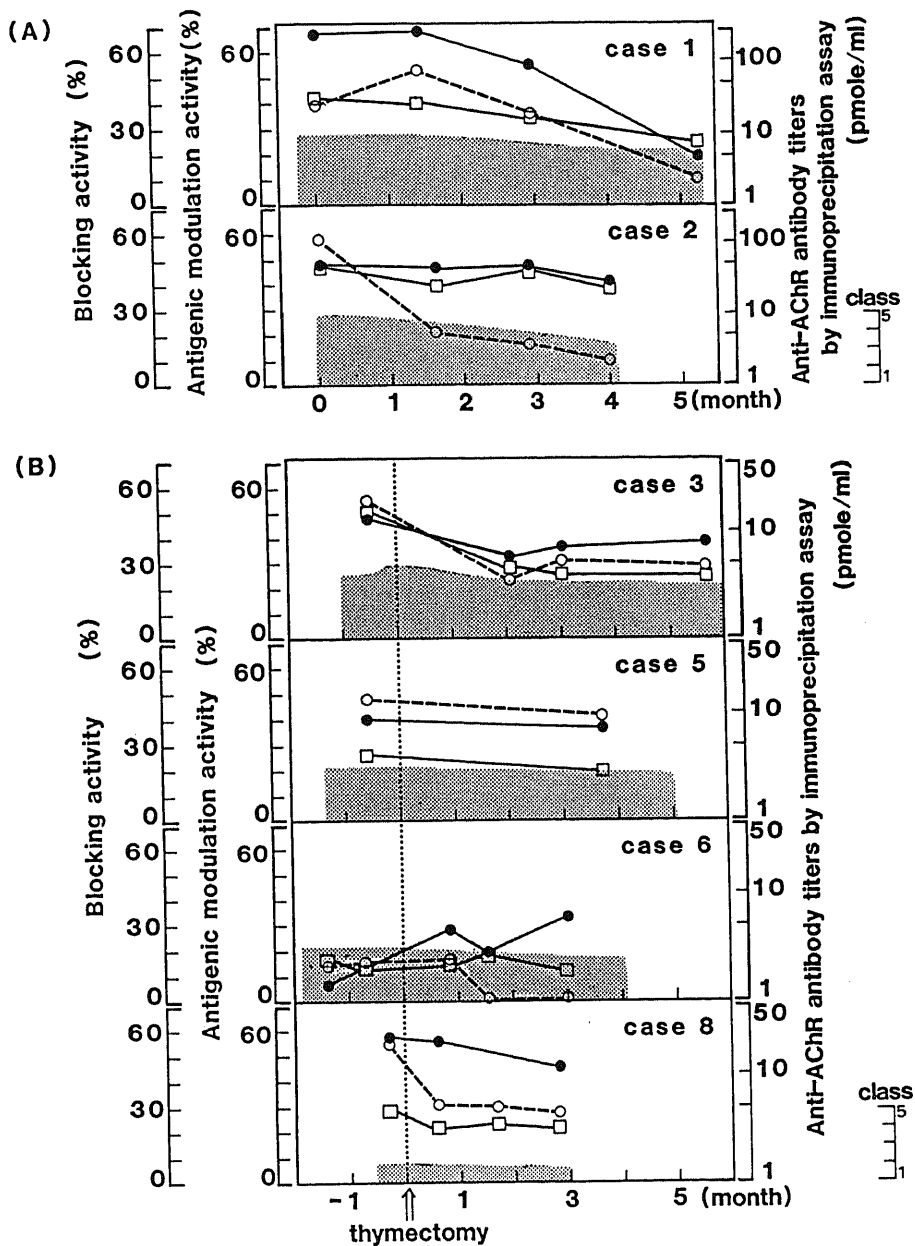


Fig. 9. The three immunological determinations of the MG sera in relation to the clinical course of the patient. ●—●, titers of anti-AChR antibody measured by the immunoprecipitation assay; ○—○, blocking activities; □—□, antigenic modulation activities. Shaded areas indicate the clinical severity based on Drachman's classification. Cases 1 and 2 (A) were thymectomized before this study. Cases 3, 5, 6, and 8 (B) were followed from the pre- to the post-thymectomy period. Details of each case are given in Table 1.

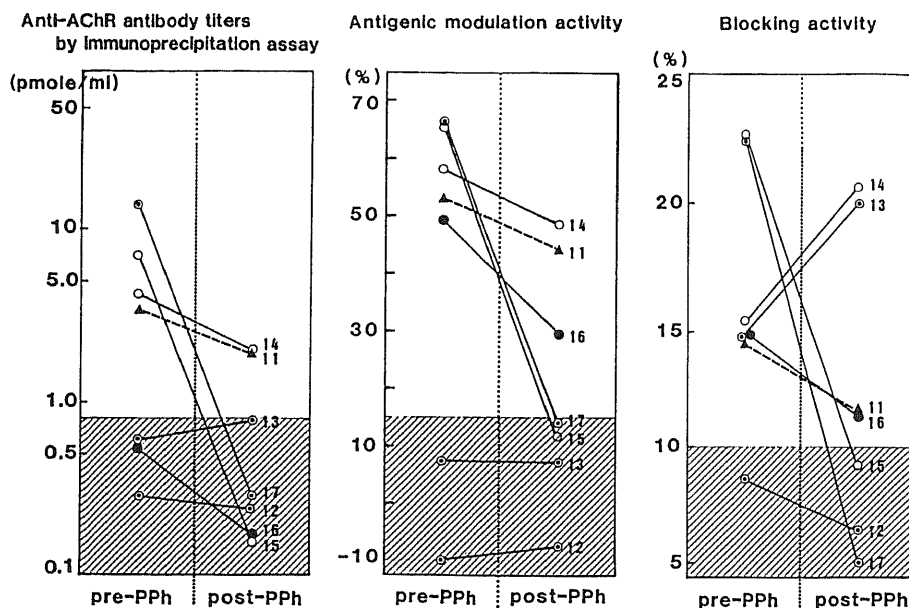


Fig. 10. Immunological determinations measured before and after plasmapheresis. Effect of plasmapheresis (PPh): (●), excellent; (◐), moderate; (○), mild; (▲), not effective. The numbers next to the symbols correspond to cases listed in Table 1. Hatched areas indicate normal ranges.

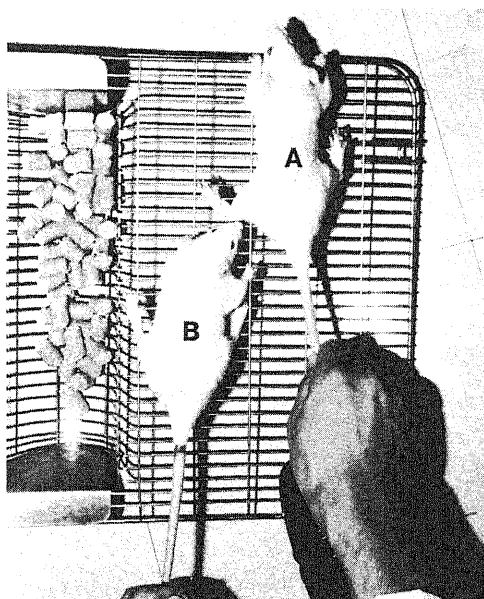


Photo 1. Clinical feature of the rats at 3rd day after injection of either 5 mg of normal human IgG (A) or 5 mg of monoclonal anti-AChR antibody (mAb-1, for details see Table 2) (B). The rat injected with mAb-1 showed mild generalized weakness, and it was easily drawn apart from the fence of the cage.

体で2つの受容体をcross-linkingする“intermolecular type”の結合は、受容体の細胞内への移行(inter-internalization)を速め崩壊を促進するが^{26), 42)}、他の2つの型の結合すなわち“one-side binding”と“intramolecular cross-linking”はAChR崩壊促進をおこさない。少なくとも一部は重複するものの、AChR上の抗原決定基と作用機序を異にする抗体を定量的に表現するものとして本研究で取り上げた3つの免疫学的測定法による抗体検出率は、二抗体免疫沈殿法93.2%、トキシン・受容体結合阻害活性測定法84.0%、AChR崩壊半減期測定法73.9%であった。

二抗体免疫沈殿法は、Appelら⁴³⁾やLindstromら⁶⁾によって確立されて以来、抗AChR抗体の最も一般的な測定法となっているが、その検出率は73~90%と報告によってかなりの開きがあり⁴⁴⁾、これは使用する抗原の種や測定法の違い、対象患者の選び方等によると思われる。測定用抗原の種の違いは測定結果の評価においては特に留意すべき点で、たとえば動物モデル(ラットEAMG)から得た抗体は、ラット骨格筋、ラット除神経骨格筋両者由来のAChRと同程度に反応するが⁴⁵⁾、ヒト抗体は後者に比べ前者由来のAChRとの免疫反応性が弱く⁴⁶⁾、またモデル作製のための免疫に用いた抗原、すなわちシビレイ由来のAChRに対する抗体価は、発症した臨床像とは相関性がないといわ

れる³⁵⁾。さらに Tzartos ら⁴⁷⁾は、MG における自己免疫反応はウィルスのような異物に対する抗体とヒト AChR との交叉反応によるものではなく、ヒト AChR そのものの刺激により誘発されたものであると報告し、Garlepp ら⁴⁸⁾は、異なる種由来の AChR と MG 患者抗体との交叉反応性は各症例ごとに異なる様式をとると報告している。従って、MG の免疫学的評価にはヒト由来 AChR を抗原として用いるのが理相的であるが、一般には本研究の如く、入手が容易なラット除

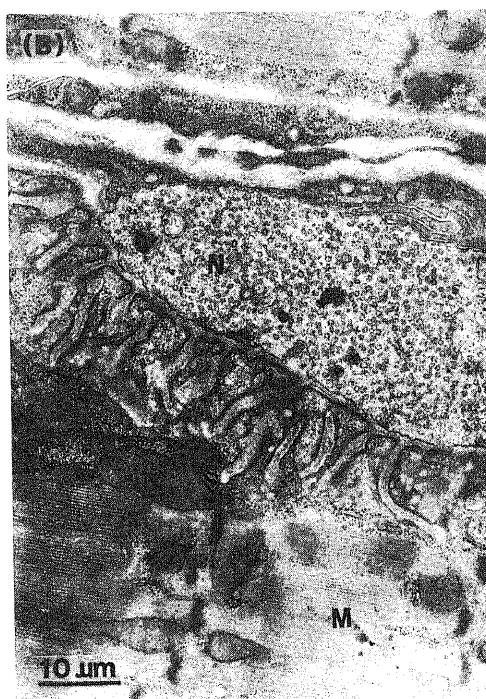
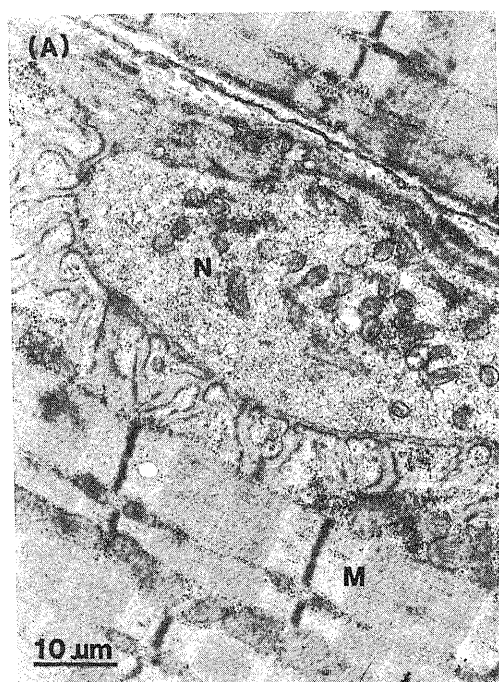


Photo. 2. Neuromuscular junction configurations in the phrenic-diaphragm muscles obtained from rats sacrificed 3 days after the injection of either 5 mg of normal human IgG (A) or 5 mg of monoclonal anti-AChR antibody (mAb-1, see Table 2) (B). M, skeletal muscle; N, nerve terminal.

Table 3. Electrophysiological findings of the phrenic-diaphragms from female Lewis rats

	(A) Control		(B) Transferred by monoclonal anti-AChR antibody	
MEPP amplitude (mV)	0.70 ± 0.142	(n=30)	0.28 ± 0.143	(n=30)
frequency (per second)	5.0 ± 1.80	(n=30)	3.6 ± 1.11	(n=30)
Resting membrane potential (mV)	75 ± 4.3	(n=30)	75 ± 6.3	(n=30)
EPP quantum content at 1 Hz	280 ± 64.7	(n=45)	272 ± 82.5	(n=30)

(A), injected with normal humal IgG (5 mg); (B), injected with 5 mg of mAb-1, a monoclonal anti-AChR antibody (for details see Table 2). Rats were sacrificed 3 days after injection. MEPP, miniature endplate potential; EPP, endplate potential. Each value represents mean ± SD.

神経骨格筋由来 AChR が用いられている。また、本法による抗体価は、上述の疾患検出率ばかりでなく臨床的重症度との相関性にも問題があるとされており⁴⁹⁾、これは本法では ACh 結合性 α -サブユニット以外の複数の部位を標的とする多様な抗体サブクラスを一括して検出しているためと思われる。本研究では、二抗体免疫沈殿法による抗体価と臨床的重症度との有意の相関は、重症群と中等度症群および重症群と軽症群各々の間にのみ認められた。

非結合阻害型で MG 発症に重要な役割を演ずる抗体の活性を表わすとされる AChR 崩壊速度促進 (抗原修飾活性) の測定は、疾患検出率は 3 法のうち最も低く、臨床的重症度との相関性では二抗体免疫沈殿法と優劣つけ難かった。本法による疾患検出率については、Lindstrom ら³⁴⁾ は抗原修飾活性の正常上限を 15% として 66% の症例で上昇が認められたと報告、著者も同様の結果を得たが、Drachman ら³³⁾ は 91% ときわめて高い検出率を得、さらに臨床的重症度と強い相関性があったと報告している。しかし、本研究で血漿交換療法の前後で得た試料について測定した本法の結果と治療効果の間に対応が認められない症例があったことや、図 9 の症例 6 のように、明らかな臨床症状のある症例の血清抗体を充分量培養系に作用させたにもかかわらず崩壊促進が認められなかった例もあることは、従来から本病主因として提唱されている抗原修飾による AChR 崩壊促進だけで MG 発病の全貌は必ずしも把握できないことを示唆している。

二抗体免疫沈殿法による抗体価と抗原修飾活性の間には、有意の相関性が認められた。これは、培養系への添加血清濃度が増加するほど AChR 崩壊が促進されるのとは一致する結果であり、さらに、二抗体免疫沈殿法で検出する複数の抗体の多くが、抗原修飾活性を有するものであることの反映であろう。

個々の症例ごとに、臨床的重症度の変遷と 3 つの免疫学的指標それぞれの推移を追ってみると、ほとんどの症例で、いずれの指標もほぼ平行した経時的変化を示した。Tzartos ら⁴⁷⁾ は、全抗 AChR 抗体に対する種々の抗 AChR モノクローナル抗体の割合の経時的変化を 1 症例において調べ、これらが臨床像や全抗体量の変化にもかかわらずほぼ一定であったと報告している。

本研究で EBV 感染による形質転換細胞から得た 4 種類のモノクローナル抗体を解析すると、mAb-2、mAb-3、mAb-4 の 3 つはラットおよびヒト由来 AChR の α -サブユニットのトキシン結合部 (すなわち ACh 結合部) またはその近傍を標的とする結合阻害型抗体であると思われ、さらに、種の違いを越えた

交叉反応性も示された。mAb-1 はラット AChR を抗原としたコンカナバリン A 法で高い結合阻害活性を示すことが特徴であった。本抗体は、非トキシン結合部との反応も示したが、培養系へ充分量添加しても AChR 崩壊の異常促進は起こさなかった。Conti-Tronconi ら²⁶⁾ はモノクローナル抗体を用い、 α と β 、 γ と δ のサブユニット間に共通の抗原性があることを証明しており、モノクローナル抗体が複数の部位を抗原決定基として認識しても矛盾はない。

モノクローナル抗体による動物への疾患移送実験についての報告は、今までにいくつかなされている。Tzartos ら⁵⁰⁾、Lennon ら^{51), 52)}、Bures ら⁵³⁾ や Gomez ら⁵⁴⁾ は、非結合阻害型のモノクローナル抗体でラットを受動免疫し筋無力症類似の症状が出現したと報告しているが、これらのうち病理所見について記載のある例では、すべて、神経筋接合部のマクロファージ浸襲、終板膜破壊等、ラット急性期 EAMG (抗体依存性補体介在性細胞性反応¹⁰⁾) 類似の形態学的変化が認められている。一方、Gomez ら⁵⁵⁾ は結合阻害型モノクローナル抗体をニワトリに静注し、筋無力症様症状の発現を臨床的、電気生理学的に確認したが、神経筋接合部に形態学的変化を認めなかった。著者のラット AChR に対し高いトキシン・受容体結合阻害活性を示す mAb-1 抗体は、その静注によってラットに臨床的筋無力症様症状をもたらすとともに、微小電極法による電気生理学的解析でも筋無力症に矛盾しない MEPP 振幅低下を認めた。しかし、神経筋接合部の電顕像では正常ヒト IgG 静注の対照ラットのそれと変わらず、急性期 EAMG 様の形態変化は伴っていなかった。従って、このラットは哺乳動物で成立した免疫薬理学的伝達ブロックの貴重な動物モデルとすることができる。本研究において受動免疫のために用いたモノクローナル抗体 IgG は 5 mg (非結合阻害型抗体活性としては 2.5×10^{-11} moles t.b.s.) で、投与量に問題がある可能性も否定できないかもしれない。しかし、Lindstrom ら⁷⁾ は正常ラット骨格筋含有 AChR 量の 20% (1×10^{-11} moles t.b.s.) のポリクローナル IgG の静注で疾患の移送を成立させており (この場合は急性期 EAMG 病態)、著者の mAb-1 抗体投与後 3 日を経ても運動終板膜に形態学的変化を認めなかったのは、注入量が不足だったためではなく、むしろ抗体の病原性作用の特異性を示唆するものと考えられる。

Simpson⁵⁶⁾ の仮説以来、MG 患者血清中に存在すると考えられる ACh と AChR の結合を阻害する物質 (おそらく抗体) に関心が持たれるようになり、Almon ら⁵⁷⁾ によって本病患者血清中に最初に検出された抗体は結合阻害型抗体であった。しかし、彼らの

用いたセファデックス (Sephadex) 法での検出率はわずかに 33% で、ヒト AChR を抗原とした Lindstrom ら⁶¹⁾ のそれも 38% であった。その後、結合阻害型抗体の測定法が検討され、Bender ら⁵⁸⁾ はヒトの生検筋を用いた酵素抗体顕微鏡法で 68%、Mittag ら⁴⁰⁾、大田ら²⁷⁾ はラット AChR を抗原としたコンカナバリン A 法で検出率をそれぞれ 67%、70% と報告したが、著者らと同様、臨床的重症度との相関性は認めなかった。Whiting ら⁵⁹⁾ は、 α -BuTx で飽和したヒト AChR アフィニティカラムを用いて α -BuTx 結合部を標的とする特異的な抗体を MG 患者血清から分離し、少なくとも一部の症例では結合阻害型抗体が本症発病に重要な役割を果たしている可能性を示したが、Vincent ら⁶⁰⁾ の報告と同様、その全抗 AChR 抗体中に占める割合は低い症例が多かった。従って、ウサギ EAMG において血清の結合阻害型抗体と非結合阻害型抗体を経時的に測定し、前者の方が臨床的变化に良く対応していたとする Zurn ら⁶¹⁾ の報告はあるものの、一般的には、AChR のトキシン結合部 (ACh 結合部またはその近傍) を標的とする抗体の MG 発症にかかわる意義を無視する考えが大勢を占めていた。ところが近年、Drachman ら³⁹⁾ はラット培養骨格筋細胞を用いて MG 血清中の結合型阻害抗体を測定し、高い検出率とともに臨床的重症度と強い相関性があることを報告した。また、Mittag ら⁶²⁾ は、二抗体免疫沈殿法で抗体が検出されなかった 48 症例の MG 患者血清のうち 29 例で結合阻害型抗体が検出されたとし、MG 発病機序におけるこの種の抗体の役割が再注目されつつある。本研究では、トキシン・受容体結合阻害活性測定法による疾患検出率は従来の多くの報告と同様、二抗体免疫沈殿法より低く、後者の方法で陰性のものが本法で陽性であった症例はなく、本法と臨床的重症度との相関性も認められなかった。しかし、本法で強い活性を示すモノクローナル抗体によるラットへの疾患移送実験は、この種の抗体が単独で MG 様症状を発現せしめ得ることを示した。Souroujon ら⁶³⁾ は、結合阻害型抗体にも抗原修飾による AChR 崩壊促進作用を認めたと報告しており、本抗体の作用機序には ACh と受容体との免疫薬理的な結合阻害だけでなく、このような機序も関与している可能性もある。また、Takamori ら^{64), 65)} は EAMG および MG で抗 AChR 抗体による前シナプス AChR 修飾作用を電気生理学的に調べ、神経終末からの ACh 量子性遊離に対する negative feedback が抗体によって開放されること、この現象は抗体のトキシン・受容体結合阻害活性と正の相関性を示すことを報告した。すなわち、結合阻害型抗体はシナプス後膜に対しては AChR の生理活性を阻害する

方向に、シナプス前膜に対しては神経終末からの ACh 遊離を促進して後シナプス性ブロックを補償する方向に動く二面性を持っていることが示唆された。このように抗原決定基を異にする抗体サブクラスはそれぞれ異なる作用機序を持つばかりではなく、1 つの抗体が MG の病像成立に多様な作用をもたらす可能性があり、Tzartos⁴⁷⁾ らは、MG はある特定の病原性作用を持つモノクローナル抗体によってのみ特異的に引き起こされるものではないとしている。本研究は、一時は疎外視されていた結合阻害型抗体が MG の病像を修飾したり、さらに一部の症例では主要な病因となっている可能性を示し、本症の発病機序や病態解明のためにはこの種の抗体の評価も必要であることを示唆した。

結 論

MG 患者 17 人から得た血清 45 検体、本症患者リンパ球の形質転換細胞クローンから得た 4 種類のモノクローナル抗 AChR 抗体を対象として抗 AChR 抗体活性を測定し、臨床的所見と対比、さらにモノクローナル抗体の 1 つで動物への疾患移送実験を行った。抗 AChR 抗体活性の測定は、理論的に異なる種類の抗体活性を検出する 3 つの方法、すなわち、抗 IgG を用いた二抗体免疫沈殿法、コンカナバリン A を用いたトキシン・受容体結合阻害活性測定法、AChR 崩壊半減期測定法で行い、前 2 法は抗原としてラット除神経骨格筋由来 AChR を用い、AChR 崩壊半減期測定法はラット骨格筋培養細胞を用いた。

1. 疾患検出率は、二抗体免疫沈殿法、トキシン・受容体結合阻害活性測定法、AChR 崩壊半減期測定法の順で高かった。

2. 臨床的重症度との相関性は、二抗体免疫沈殿法、AChR 崩壊半減期測定法で認められたが、トキシン・受容体結合阻害活性測定法では認められなかった。

3. 個々の症例の臨床的経過と 3 指標の経時的変化の間には多くの場合対応が認められたが、3 指標間に優劣はなかった。

4. 血漿交換により 3 指標の改善が認められたにも関わらず臨床的には無効であった例、治療前から 3 指標が陰性であったにも関わらず血漿交換療法が有効であった例等があり、3 指標だけで本治療法の適応の決定、効果の予測や説明はできなかった。

5. 4 種類のモノクローナル抗体はラット除神経骨格筋由来の AChR に対しトキシン・受容体結合阻害活性測定法で高い値を示し、結合阻害型抗体と考えられた。

6. 高いトキシン・受容体結合阻害活性を示すモノクローナル抗体による疾患移送実験では、臨床像およ

び微小電極法による電気生理学的解析で筋無力症類似の病態を認めたが、神経筋接合部の電顕学的形態変化を伴わず、結合阻害型抗体単独で MG を発症せしめ得ることを示した。本病の発病機序や病態の解明には、この種の抗体の関与に注目する必要があることを強調した。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師高守正治教授に衷心より感謝の意を捧げます。また、本研究に際し御助力、御教示下さいました井手芳彦博士、坂戸俊一博士、奥村誠一博士ならびに御協力をいただきました教室員各位に深甚の謝意を表します。さらに、貴重な試料を御分与下さいました順天堂大学脳神経内科橋本博士教授、佐藤猛助教授に深謝申し上げます。

本研究の一部は厚生省免疫性神経疾患調査研究助成金、同神経疾患研究委託費および財団法人東京生化学研究会研究助成金によって行われた。

文 献

- 1) Lee, C. Y.: Chemistry and pharmacology of polypeptide toxins in snake venoms. *Ann. Rev. Pharmacol.*, **12**, 265-266 (1972).
- 2) Changeux, J-P., Kasai, M. & Lee, C-Y.: Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **67**, 1241-1247 (1970).
- 3) Patrick, J. & Lindstrom, I.: Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science*, **180**, 871-872 (1973).
- 4) Lennon, V. A., Lindstrom, J. M. & Seybold, M. E.: Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs. *J. Exp. Med.*, **141**, 1365-1375 (1975).
- 5) Lindstrom, J. M., Einerson, B. L., Lennon, V. A. & Seybold, M. E.: Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis. I. Immunogenicity of syngeneic muscle acetylcholine receptor and quantitative extraction of receptor and antibody-receptor complexes from muscles of rats with experimental autoimmune myasthenia gravis. *J. Exp. Med.*, **144**, 726-738 (1976).
- 6) Lindstrom, J. M., Seybold, M. E., Lennon, V. A., Whittingham, S. & Dnane, D. D.: Antibody to acetylcholine receptor in myasthenia gravis: Prevalence, clinical correlates, and diagnostic value. *Neurology*, **26**, 1054-1059 (1976).
- 7) Lindstrom, J. M., Engel, A. G., Seybold, M. E., Lennon, V. A., & Lambert, E. H.: Pathological mechanisms in experimental autoimmune myasthenia gravis II. Passive transfer of experimental autoimmune myasthenia gravis in rats with anti-acetylcholine receptor antibodies. *J. Exp. Med.*, **144**, 739-753 (1976).
- 8) Toyka, K. V., Drachman, D. B., Griffin, D. E., Pestronk, A., Winkelstein, J. A., Fishbeck, K. H. & Kao, I.: Myasthenia gravis; Study of humoral immune mechanisms by passive transfer to mice. *N. Engl. J. Med.*, **296**, 125-131 (1977).
- 9) Engel, A. G., Sakakibara, H., Sahashi, K., Lindstrom, J. M., Lambert, E. H. & Lennon, V. A.: Passively transferred experimental autoimmune myasthenia gravis; Sequential and quantitative study of the motor end-plate fine structure and ultrastructural localization of immune complexes (IgG and C3), and of the acetylcholine receptor. *Neurology*, **29**, 179-188 (1979).
- 10) Engel, A. G., Lambert, E. H. & Howard, A. M.: Immune complexes (IgG and C3) at the motor end-plate in myasthenia gravis; Ultrastructural and light microscopic localization and electrophysiologic correlations. *Mayo Clin. Proc.*, **52**, 267-287 (1977).
- 11) Fambrough, D. M., Drachman, D. B. & Satyamurti, S.: Neuromuscular junction in myasthenia gravis: Decreased acetylcholine receptor. *Science*, **182**, 293-295 (1973).
- 12) Kao, I. & Drachman, D. B.: Myasthenic immunoglobulin accelerates acetylcholine receptor degradation. *Science*, **196**, 527-529 (1977).
- 13) Heinemann, S., Bevan, S., Kullberg, R., Lindstrom, J. & Rice, J., Modulation of acetylcholine receptor by antibody against the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 3090-3094 (1977).
- 14) Appel, S. H., Anwyl, R., McAdams, M. W. & Elias, S.: Accelerated degradation of acetylcholine receptor from cultured rat myotubes with myasthenia gravis sera and globulins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74**, 2130-2134 (1977).
- 15) Engel, A. G., Tsujihata, M., Lambert, E. H., Lindstrom, J. M. & Lennon, V.: Experimental autoimmune myasthenia gravis: A sequential and quantitative study of the neuromuscular junction ultrastructure and electrophysiologic correlations. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **35**, 569-587 (1976).
- 16) Sahashi, K., Engel, A. G., Lambert, E. H. & Howard, M.: Ultrastructural localization of the

terminal and lytic ninth complement component (C9) at the motor end-plate in myasthenia gravis. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **39**, 160-172 (1980).

- 17) Drachman, D. B., Adams, R. N., Josifek, L. F., Pestronk, A. & Stanley, E. F.: Antibody-mediated mechanisms of ACh receptor loss in myasthenia gravis: Clinical relevance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 175-188 (1981).
- 18) Tzartos, S. J., Rand, D. E., Einarson, B. L. & Lindstrom, J. M.: Mapping of surface structures of electrophorus acetylcholine receptor using monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8635-8645 (1981).
- 19) Dwyer, D. S., Bradley, R. J., Urquhart, C. K. & Kearney, J. F.: Naturally occurring anti-idiotypic antibodies in myasthenia gravis patients. *Nature*, **301**, 611-614 (1983).
- 20) Kamo, I., Furukawa, s., Tada, a., Mano, Y., Iwasaki, Y., Furuse, T., Ito, N., Hayashi, K. & Satoyoshi, E.: Monoclonal antibody to acetylcholine receptor: Cell line established from thymus of patient with myasthenia gravis. *Science*, **215**, 995-997 (1982).
- 21) Lindstrom, J., Tzartos, S. & Gullick, W.: Structure and function of the acetylcholine receptor molecule studied using monoclonal antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 1-19 (1981).
- 22) Gullick, W. J., Tzartos, S. & Lindstrom, J.: Monoclonal antibodies as probes of acetylcholine receptor structure. 1. Peptide mapping. *Biochemistry*, **20**, 2173-2180 (1981).
- 23) Gullick, W. J. & Lindstrom, J. M.: Mapping of the binding of monoclonal antibodies to acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry*, **22**, 3312-3320 (1983).
- 24) Gullick, W. J. & Lindstrom, J. M.: Structural similarities between acetylcholine receptors from fish electric organs and mammalian muscle. *Biochemistry*, **21**, 4563-4569 (1982).
- 25) Watters, D. & Maelicke, A.: Organization of ligand binding sites at the acetylcholine receptor: A study with monoclonal antibodies. *Biochemistry*, **22**, 1811-1819 (1983).
- 26) Conti-Tronconi, B., Tzartos, S. & Lindstrom, J.: Monoclonal antibodies as probes of acetylcholine receptor structure. 2. Binding to native receptor. *Biochemistry*, **20**, 2181-2191 (1981).

- 27) 大田光熙, 西谷 裕, 松原史よ: 抗アセチルコリンレセプター抗体. *臨床免疫*, **12**, 751-758 (1980).
- 28) Deverotes, P. N. & Gambrough, D. M.: Acetylcholine receptor turnover in membranes of developing muscle fibers. *J. Cell Biology*, **65**, 335-358 (1975).
- 29) Merlie, J. P., Changeux, J. P. & Gros, F.: Acetylcholine receptor degradation measured by pulse chase labelling. *Nature*, **264**, 74-76 (1976).
- 30) Fambrough, D. M.: Control of Acetylcholine receptors in skeletal muscle. *Physiol. Rev.*, **59**, 165-227 (1979).
- 31) Guesdon, J. L., Ternynck, T. & Avrameas, S.: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1131-1139 (1979).
- 32) Cull-Candy, S. G., Miledi, R., Trautmann, A. & Uchitel, O. D.: On the release of transmitter at normal, myasthenia gravis and myasthenic syndrome affected human end-plate. *J. Physiol.*, **299**, 621-638 (1980).
- 33) Drachman, D. B., Adams, R. N., Josifek, L. F. & Self, S. G.: Functional activities of auto-antibodies to acetylcholine receptors and the clinical severity of myasthenia gravis. *N. Engl. J. Med.*, **307**, 769-775 (1982).
- 34) Conti-Tronconi, B., Brignonzi, A., Fumagalli, G., Sher, M., Cosi, V., Piccolo, G. & Clementi, F.: Antibody-induced degradation of acetylcholine receptor in myasthenia gravis: Clinical correlations and pathogenetic significance. *Neurology*, **31**, 1440-1444 (1980).
- 35) Lindstrom, J. M., Lennon, V. A., Seybold, M. E., Whittingham, S.: Experimental autoimmune myasthenia gravis and myasthenia gravis: Biological and immunological aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **274**, 254-274 (1976).
- 36) Conti-Tronconi, B. M. & Raftery, M. A.: The nicotinic cholinergic receptor: Correlation of molecular structure with functional properties. *Ann. Rev. Biochem.*, **51**, 491-530 (1980).
- 37) Lindstrom, J. M., Walter, B. & Einarson, B.: Immunological similarities between subunits of acetylcholine receptors from *Torpedo*, *Electrophorus*, and mammalian muscle. *Biochemistry*, **18**, 4470-4480 (1979).
- 38) Yosida Momoi, M. & Lennon, V. A.:

Purification and biochemical characterization of nicotinic acetylcholine receptors of human muscle. *J. Biol. Chem.*, **257**, 12757-12764 (1982).

39) **Froehner, S. C., Douville, K., Klink, S. & Culp, W. J.** : Monoclonal antibodies to cytoplasmic domains of acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.*, **258**, 7112-7120 (1983).

40) **Mittag, T., Kornfeld, P., Tormay, A. & Woo, c.** : Detection of anti-acetylcholine receptor factors in serum and thymus from patients with myasthenia gravis. *N. Engl. J. Med.*, **294**, 691-694 (1976).

41) **Lindstrom, J., Anholt, R., Einarson, B., Engel, A., Osame, M. & Montal, M.** : Purification of acetylcholine receptors, reconstitution into lipid vesicles, and study of agonist-induced cation channel regulation. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8340-8350 (1980).

42) **Drachman, D. B., Angus, C. W., Adams, R. N., Michelson, J. D. & Haffman, G. J.** : Myasthenic antibodies cross-link acetylcholine receptors to accelerate degradation. *N. Engl. J. Med.*, **298**, 1116-1122 (1978).

43) **Appel, S. H., Almon, R. R. & Levy, N.** : Acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. *N. Engl. J. Med.*, **293**, 760-761 (1975).

44) **Oosterhuis, H. J. G. H.** : Myasthenia gravis, p. 108-112. Churchill Livingstone, Edinburgh. 1984.

45) **Weinberg, C. B., & Hall, Z. W.** : Antibodies from patients with myasthenia gravis recognize determinants unique to extrajunctional acetylcholine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **76**, 504-508 (1979).

46) **Brookes, J. P. & hall, Z. W.** : Acetylcholine receptors in normal and denervated rat diaphragm muscle. II. Comparison of junctional and extra-junctional receptors. *Biochemistry*, **14**, 2100-2106 (1975).

47) **Tzartos, S. J., Seybold, M. E. & Lindstrom, J. M.** : Specificities of antibodies to acetylcholine receptors in sera from myasthenia gravis patients measured by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **79**, 188-192 (1982).

48) **Garlepp, M. J. H., kay, P. H., Dawkins, R. L., Bucknall, R. C. & Kemp, A.** : Cross-reactivity of anti-acetylcholine receptor autoantibodies. *Muscle and Nerve*, **4**, 282-288 (1981).

49) **Limburg, P. C., The, T. C., Cummel-Tappel, E. & Oosterhuis, H. J. G. H.** : Anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis; Part 1. Relation to clinical parameters in 250 patients. *J. Neurol. Sci.*, **58**, 357-370 (1983).

50) **Tzartos, S. J. & Lindstrom, J. M.** : Monoclonal antibodies used to probe acetylcholine receptor structure: Localization of the main immunogenic region and detection of similarities between subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 755-759 (1980).

51) **Lennon, V. A. & Lambert, E. C.** : Myasthenia gravis induced by monoclonal antibodies to acetylcholine receptors. *Nature*, **285**, 238-240 (1980).

52) **Lennon, V. A. & Lambert, E. H.** : Monoclonal antibodies to acetylcholine receptors: Evidence for a dominant idotype and requirement of complement for pathogenicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 77-96 (1981).

53) **Burres, S. A., Crayton, J. W., Gomez, C. M. & Richman, D. P.** : Myasthenia induced by monoclonal anti-acetylcholine receptor antibodies: Clinical and electrophysiological aspects. *Ann. Neurol.*, **9**, 563-568 (1981).

54) **Gomez, C. M., Richman, D. P., Burres, S. A. & Arnason, G. W.** : Monoclonal hybridoma anti-acetylcholine receptor antibodies: antibody specificity and effect of passive transfer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **377**, 97-109 (1981).

55) **Gomez, C. M. & Richman, D. P.** : Anti-acetylcholine receptor antibodies directed against the α -bungarotoxin binding site induce a unique form of experimental myasthenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 4089-4093 (1983).

56) **Simpson, J. A.** : Myasthenia gravis. A new hypothesis. *Scott. Med. J.*, **5**, 419-436 (1960).

57) **Almon, R. R., Andrew, C. G., & Appel, S. H.** : Serum globulin in myasthenia gravis: Inhibition of α -bungarotoxin binding to acetylcholine receptors. *Science*, **186**, 55-57 (1974).

58) **Bender, A. N., Ringel, S. P. & Engel, W. K.** : The acetylcholine receptor in normal and pathologic states; Immunoperoxidase visualization of alpha-bungarotoxin binding at a light and electron-microscopic level. *Neurology*, **26**, 477-483 (1976).

59) **Whiting, P. J., Vincent, A. & Newsom**

- Davis, J.: Acetylcholine receptor antibody characteristics in myasthenia gravis; Fractionation of α -bungarotoxin binding site antibodies and their relationship to IgG subclass. *J. Neuroimmunol.*, 5, 1-9 (1983).
- 60) Vincent, A. & Newsom-Davis, J.: Acetylcholine receptor antibody characteristics in myasthenia gravis. I. Patients with generalized myasthenia or disease restricted to ocular muscles. *Clin. exp. Immunol.*, 49, 257-265 (1982).
- 61) Zurn, A. D. & Fulpius, B. W.: Study of two different subpopulations of anti-acetylcholine receptor antibodies in a rabbit with experimental autoimmune myasthenia gravis. *Eur. J. Immunol.*, 8, 529-532 (1977).
- 62) Mittag, T. W., Xu, X. Moshoyiannis, H., Kornfeld, P. & Jenkins, G.: Analysis of false negative results in the immunoassay for anti-acetylcholine receptor antibodies in myasthenia gravis. *Clin Immunol. Immunopathol.*, 31, 191-201 (1984).
- 63) Souroujon, M. C., Mochly-Rosen, D., Gordon, A. S. & Fuchs, S.: Interaction of monoclonal antibodies to torpedo acetylcholin receptor with the receptor of skeletal muscle. *Muscle & Nerve*, 6, 303-311 (1983).
- 64) Takamori, M., Sakato, S. & Okumura, S.: Presynaptic function modified by acetylcholine-receptor interaction in experimental autoimmune myasthenia gravis. *J. Neurol. Sci.*, 66, 245-253 (1984).
- 65) Takamori, M., Yasuda, A., Okumura, S. & Tanihara, M.: Presynaptic modification by anti-acetylcholine receptor antibody in neuromuscular transmission: Studies on myasthenic sera and monoclonal antibody produced by transformed lymphocytes. *Neurology*, 36, (1986) (In press).

Study on the Pathogenesis of Myasthenia Gravis — Analysis of the Heterogenous Anti-acetylcholine Receptor Antibodies Atsuko Yasuda, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — *J. Jap. Med. Soc.*, 95, 170—190 (1986)

Key words: myasthenia gravis, anti-acetylcholine receptor antibody, heterogeneity

Abstract

The anti-acetylcholine receptor (AChR) antibody levels of 45 sera from 17 patients of myasthenia gravis (MG) were measured by three immunological methods: precipitation of α -bungarotoxin (BuTx)-labeled AChR with anti-IgG, blocking of α -BuTx-binding to AChR using concanavalin A-sepharose (toxin-blocking activity) and the effects of complement-inactivated MG serum on the half-life of AChRs of cultured rat myotubes (antigenic modulation activity). The former assays used the denervated rat skeletal muscle as an antigen. These results were compared with the clinical severity at a given moment, the clinical course of each patient and the effect of plasmapheresis. Anti-AChR antibodies were detected in 93.2 percent of 45 sera by immunoprecipitation assay, 84.0 percent by the toxin-blocking assay; 73.9 percent induced an abnormal acceleration of AChR degradation. The mean titer by the immunoprecipitation assay of a severe disease differed from those of a mild or moderate disease. Significant difference was noted in the antigenic modulation activity only when comparison was made between mild and severe diseases. The toxin-blocking activity did not relate to the clinical state.

Each of the immunological determinations changed in parallel with clinical alteration in 5 of 6 MG patients studied in the course of the disease, but the remaining one did not. Only 3 of 7 MG patients showed the change in determinations that correlated with the clinical effect of plas-

mapheresis. Therefore, the immunological determinations dealt with in the present study may not be able to fully disclose the pathogenesis of the disease. Four monoclonal anti-AChR antibodies were produced by human lymphocyte cell lines transformed in vitro with Epstein-Barr virus. One of them, which did not accelerate rat-AChR degradation but showed a high activity in blocking the toxin-binding to rat-AChR, was injected intravenously (5 mg) to an adult female rat of the Lewis strain. An overt weakness appeared in less than a few hours. The neuromuscular junctions of the phrenic-diaphragm were studied in terms of the intracellular microelectrode and electron microscopic observation 3 days after the injection. Electrophysiological findings were compatible with a myasthenic block but no ultrastructural alteration of neuromuscular junction was seen, unlike the transfer by monoclonal antibodies of the non-blocking type. These findings suggest that antibodies acting at or near the acetylcholine binding site of the AChR play a modulatory role in the pathogenesis of MG, and have an important pathogenicity in some MG patient or in some stage of the disease.